

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 44 19 024 C 1

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 12 N 11/08  
C 12 N 11/18

⑳ Aktenzeichen: P 44 19 024.7-41  
㉔ Anmeldetag: 31. 5. 94  
㉕ Offenlegungstag: —  
㉖ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 19. 10. 95

DE 44 19 024 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

㉗ Patentinhaber:

Institut für Chemo- und Biosensorik, 48161 Münster,  
DE

㉘ Vertreter:

Pfenning, J., Dipl.-Ing., 10707 Berlin; Meinig, K.,  
Dipl.-Phys., 80336 München; Butenschön, A.,  
Dipl.-Ing. Dr.-Ing., Pat.-Anwälte; Bergmann, J.,  
Dipl.-Ing., Pat.- u. Rechtsanw., 10707 Berlin; Nöth, H.,  
Dipl.-Phys.; Reitzle, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;  
Kraus, H., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte, 80336 München

㉙ Erfinder:

Rüdel, Ulrich, 48161 Münster, DE; Gründig, Bernd,  
Dr., 04318 Leipzig, DE

㉚ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

CA 100: 99 096 d;

㉛ Coimmobilisatschicht

㉜ Die Erfindung betrifft eine Coimmobilisatschicht, die - in  
eine Polymermatrix eingeschlossen - Dehydrogenase und/  
oder Reduktase und ihre Cofaktoren bzw. deren Komplexe  
enthält, wobei der Cofaktor an einen polymeren Spacer  
gekoppelt ist.

DE 44 19 024 C 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Coimmobilisatschicht, die aus einer Polymermatrix besteht, wobei diese Polymermatrix Dehydrogenasen und/oder Reduktasen mit ihren Cofaktoren bzw. deren Komplexe gebunden an einen polymeren Spacer enthält. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer derartigen Schicht sowie deren Verwendung für Enzymsensoren.

In den letzten zwei Dekaden wurden eine Reihe verschiedener Untersuchungen auf den Gebieten der Enzymtechnologie und Biosensorik vorgenommen, die zum Ziel hatten, die Notwendigkeit der Cofaktorzugabe oder -nachführung beim Arbeiten mit Bioreaktoren und -sensoren mit Dehydrogenasen zu umgehen.

So wurden eine Reihe von Verfahren entwickelt, die die Kopplung des Cofaktors an das Apoenzym zum Ziel hatten, um sogenannte "semisynthetische Holo-Dehydrogenasen" zu erhalten. Stellvertretend seien hier die Arbeiten von Mansson et al. (Meth. Enzymol. 89, 457—468) genannt, die ein NAD-Derivat an Leberalkohol-Dehydrogenase koppelten. Üblicherweise sind derartige Methoden mit einem hohen präparativem Aufwand verbunden. Zur Anbindung aktivierter Cofaktoraloga ist eine modifizierbare Gruppe in der Nähe der Cofaktor-Bindungsstelle erforderlich, wie sie Persson et al. (Biotechnology 9 (1991) 280—284) an Glycosedehydrogenase genetisch erzeugten, um sodann aktiviertes Thiol-NAD über eine Disulfidbindung anzubinden. Andernfalls ist man auf geeignete reaktive Gruppen im nativen Enzym angewiesen, so daß eine Optimierung des Spacers zwischen Enzym und Cofaktor erforderlich ist. Allerdings kann durch die mit jeder Modifizierung einhergehende strukturelle Veränderung des Enzyms dessen Aktivität beeinträchtigt werden. Weiterhin sollten hier die Untersuchungen von Yomo et al. (Eur. J. Biochem. 200 (1991) 759—766; Eur. J. Biochem. 203 (1992) 533—542) erwähnt werden, die mit Polyethylen-glykol (PEG) als Spacer aktive Konjugate aus Mediator, Cofaktor und Enzym darstellten. Auch hier ist die Herstellung mit aufwendigen Aufreinigungen der modifizierten Enzyme verbunden. Zudem stellt sich gerade bei Verwendung von PEG als relativ langem Spacer die Frage, ob hier nicht besser auf die Anbindung an das Enzym verzichtet werden sollte und statt dessen Enzyme wie Cofaktor z. B. kovalent auf einem Träger fixiert werden sollten. Somit würde die für die meisten biotechnologischen und biosensorischen Anwendungen ohnehin erforderliche Immobilisierung gleichzeitig vorgenommen, ohne daß eine zusätzliche strukturelle Beeinträchtigung durch die Cofactorfixierung in Kauf genommen werden müßte.

Derartigen Verfahren ist gemeinsam, daß die Enzym- und Cofaktor-Modifizierungen relativ aufwendig sind und für jedes Enzym die Methoden einzeln optimiert werden müssen. Zudem ist für viele Anwendungen, insbesondere in der Biosensorik, eine Immobilisierung der so erhaltenen Holoenzyme erforderlich, die deren Aktivität weiter beeinträchtigen könnte. Daher ist sowohl die Entwicklung als auch die Produktion von Dehydrogenasen/Reduktasen-basierenden stoffwandelnden Katalysesystemen bzw. Biosensoren auf Basis solcher Methoden aufwendig und katalytisch wenig effizient.

Ein anderer Ansatz besteht in einer Immobilisierung von Enzym und Coenzym nebeneinander unter Ermöglichung ihrer Wechselwirkung. Hierbei wird gleichzeitig die Immobilisierung der Biokomponente bewerkstelligt, was für die meisten Anwendungen ein bedeutender

Vorteil ist. Coimmobilisierungen auf der Basis von kovalenter Anbindung von Dehydrogenase und modifiziertem Cofaktor an einem gemeinsamen Träger wurden von Mosbach et al. (Meth. Enzymol. 89, 457—468) beschrieben. Als Träger diente Agarose. Die Präparationen zeigten enzymatische Aktivität, die jedoch in Lösung mit gelöstem freien Cofaktor noch erheblich anstieg. Offensichtlich garantierte die Coimmobilisierung also nicht die Präsenz der für maximale Aktivität erforderlichen Mengen Cofaktor. Eine Regeneration des gebundenen Cofaktors mittels eines organischen Farbstoffes war nicht möglich. Damit ist diese Methode zum Einsatz in amperometrischen Biosensoren mit mediiertem NADH-Detektion ungeeignet.

Ebenfalls bekannt ist die "site-to-site"-Coimmobilisierung zweier Enzyme mit NAD mit einem gemeinsamen Cofaktormolekül. So beschreiben z. B. Jun et al. (Dyes and Pigments 16 (1991) 11—17) die Coimmobilisierung von Alkoholdehydrogenase, Lactatdehydrogenase und NAD, die ein enzymatisches Regenerieren von NAD erlaubt.

Mazid und Laidler (Biotechnol. Bioeng. 24 (1982) 2087—2097) beschreiben die Anbindung von Alkoholdehydrogenase und einem Cofaktoralog nebeneinander auf Nylon. Die erhaltene Präparation wies enzymatische Aktivität auf und der gebundene Cofaktor konnte auch mittels eines organischen Farbstoffes regeneriert werden. Wie bei allen kovalenten Immobilisierungen ist mit dieser auf Nylon als Substrat beschränkten Methode jedoch weder eine lokal begrenzte Immobilisierung noch eine beliebige Steigerung der Menge immobilisierter Enzyms möglich.

Versuche, bei der Quervernetzung von Dehydrogenasen mit Glutaraldehyd und gegebenenfalls BSA auch NAD mit zu vernetzen, beschreiben Blaedel und Jenking (Anal. Chem. 48 (1976) 1240—1246) sowie Legoy et al. (Biochemie 62 (1980) 341—345). Bei der chemischen Anbindung des NAD an das Enzym durch Verknüpfung von Aminofunktionen ist jedoch ein erheblicher Aktivitätsverlust zu erwarten. Die gemessene Aktivität könnte auch durch im quervernetzten Gel lose eingeschlossenen oder adsorbierten Cofaktor bedingt sein. Zudem ist eine Immobilisierung durch Quervernetzung sehr problematisch, und die Methode als solche erfordert relativ große Mengen an Enzym bei oftmals deutlichem Aktivitätsverlust.

Yabuki et al. versuchten, Dehydrogenasen, einen Mediator und NAD(P) in elektrochemisch erzeugtes Polypyrrol einzuschließen. Wenngleich man ein Auswaschen des Cofaktors erwarten sollte, gelang hiermit die Detektion der Substrate Ethanol und Glutamat. Allerdings wiesen die Sensoren relativ lange Einstellzeiten sowie eine mangelhafte Sensitivität auf, die auf eine schlechte Wechselwirkung zwischen Enzym und Cofaktor hindeuten. Im Gegensatz zu anderen Methoden erlaubt die Immobilisierung durch Elektropolymerisation jedoch eine Kontrolle der Enzymmenge, der Schichtdicke der Immobilisatschicht und eine lokal definierte Immobilisierung etwa auf einzelnen aktiven Flächen von Elektrodenarrays.

Die Adsorption von Alkoholdehydrogenase und NAD an PVC-Membranen und anschließendes Abdecken mit einer weiteren Membran wurde von Gotoh und Karube (Anal. Lett. 27 (2) (1994) 273—284) zur Herstellung eines Alkoholsensors ausgenutzt. Jedoch waren die erhaltenen Signale äußerst gering. Die Methode ermöglicht offenbar keine spezifische Immobilisierung hinreichender Mengen an Cofaktoren.

Den Einschluß von Enzym in ein radikalisch polymerisierbares Polyacrylamidgel beschreiben Yamazaki und Maeda (Biotechnol. Bioeng. 24 (1982) 1915—1918). Neben der aufwendigen Präparation der zur kovalenten Anbindung an das Einschlußpolymer entsprechend modifizierten Cofaktoren ist vor allem zu nennen, daß die kovalente Anbindung an die nichtlösliche Immobilisierungsmatrix eine optimale Wechselwirkung Cofaktor/Enzym räumlich beeinträchtigen dürfte.

Eine Reihe anderer in der Literatur beschriebener Sensoren auf Basis NAD(P)-abhängiger Dehydrogenasen bedienen sich aufgrund der geschilderten Problematik einer Versorgung mit NAD aus verschiedenen gearteten Reservoirs. Dabei wird der Cofaktor z. B. aus dem Elektrodenmaterial selbst (Biosensors & Bioelectronics 6 (1991) 681—687) freigesetzt. Es handelt sich nicht um einen reagenzlosen Meßfühler, vielmehr wird ein Reagenz von "Sensor" selbst stetig freigesetzt. Ein Nachteil solcher Systeme liegt vor allem darin, daß — abgesehen von der Kontamination der Probe — hierfür hohe Mengen Cofaktor, also auch Enzym, im Reservoir bzw. in der Elektrodenmatrix erforderlich sind (z. B. 28 Gew.-% und 14 Gew.-% NAD in obengenannter Literatur), so daß damit der Kostenvorteil eines Sensors im Vergleich z. B. zu einer FIA-Anordnung mit Cofaktor-Versorgung nicht mehr gegeben ist. Es handelt sich hier also nicht um eine Immobilisierung im eigentlichen Sinne.

Die geschilderten Verfahren führten trotz einiger Teilerfolge nicht zu allgemein etablierten Methoden, die die Enzymklasse der Dehydrogenasen ähnlich attraktiv für Biosensorik und Enzymtechnologie machten wie die Oxidasen, die keinen Cofaktor benötigen.

Aufgrund der Problematik der oben geschilderten Untersuchungen wurden alternativ sogenannte Membranreaktoren untersucht. Hierbei werden bioaktive Moleküle hinter Dialysemembranen eingeschlossen, welche ein Substrat passieren kann. Solche Reaktoren können dann prinzipiell anstelle von Immobilisatschichten verwendet werden. Bereits Blaedel und Jenkins (Anal. Chem. 48 (1976) 1240—1246) hatten festphasengebundenes Coenzym zusammen mit einer Enzymlösung hinter einer Dialysemembran fixiert. Durch Ankopplung von aktiviertem NAD an verschiedene wasserlösliche Polymere gelingt die Synthese von makromolekularen Cofaktoren, die nur eine geringfügige Beeinträchtigung der Dehydrogenasen-Aktivität im Vergleich zum freien Cofaktor mit sich bringen. Solche polymermodifizierte Cofaktoren lassen sich leicht hinter Dialysemembranen zurückhalten. Dabei hat Polyethylenglykol-modifiziertes NAD die größte Bedeutung erlangt. Membranreaktoren mit Dehydrogenasen und PEG-NAD können vor Elektroden fixiert werden, um so reagenzlose Enzymelektroden zu erhalten (GBF Monogr. 13, 93—98). Ein Mediator kann in der Meßlösung gelöst oder auch an der Elektrodenoberfläche adsorbiert vorliegen. Das einfache Grundprinzip erlaubt die Verwendung für die verschiedensten NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen. Als Nachteile dieser Systeme ist vor allem die mangelnde Langzeitstabilität zu nennen. Sie ist leicht zu erklären, da Enzyme wie modifizierter Cofaktor gelöst vorliegen. Zudem ist die Präparation solcher Membranreaktoren aufwendig; die Reaktoren mit der wäßrigen Enzym/PEG-NAD-Lösung müssen im Gegensatz zu lagerstabilen Coimmobilisatschichten vor der Messung frisch vorbereitet werden. Weiterhin weisen sie relativ hohe Ansprechzeiten auf. Dieser Effekt wird durch die verlangsamte Diffusion des makromolekularen NAD-Derivates erklärt (Sens. Act. B, 13—14

(1993) 366—371).

Aus CA 100 : 990 96 d ist eine Coimmobilisatschicht bekannt in die Dehydrogenase und NAD eingeschlossen ist. Das Enzym ist dabei mit dem Matrixmaterial verknüpft.

Allen bekannten Verfahren ist gemeinsam, daß die resultierenden Coimmobilisate bei relativ aufwendiger Herstellung für reale Anwendungen nur eine unzureichende Stabilität und vergleichsweise geringe enzymatische Aktivitäten aufweisen.

Ausgehend hiervon ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Coimmobilisatschicht anzugeben, die eine hohe Stabilität und eine gleichzeitig gegenüber dem Stand der Technik erhöhte enzymatische Aktivität aufweist.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1, hinsichtlich des Verfahrens durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 10 und in bezug auf die Verwendung durch Patentanspruch 15. Die Unteransprüche zeigen vorteilhafte Weiterbildungen auf.

Erfindungsgemäß wird vorgeschlagen, die Dehydrogenase und/oder Reduktase mit ihren Cofaktoren bzw. deren Komplexen in eine Polymermatrix einzuschließen, wobei der Cofaktor an einen polymeren Spacer mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 20 000 gekoppelt ist. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, daß durch diese Maßnahme eine gegenüber dem Stand der Technik deutlich erhöhte Stabilität und gleichzeitig eine erhöhte enzymatische Aktivität erreicht werden. Als polymere Matrix dient dabei ein polymeres Netzwerk, bevorzugt aus Polyacrylat, Polyvinylalkohol, Polysulfonsäureester, Polysaccharid, Polypeptid, quervernetztes Polypeptid, Polyurethan, Polypyrrol, Polyanilin, Poly-o-phenylendiamin, Polyphenol oder Polyphenothiazin. Die Aufgabe des Polymers ist dabei ausschließlich, das Enzym bzw. die Enzyme und den Cofaktor bzw. dessen Komplex schonend und stabilisierend physikalisch einzuschließen. Bevorzugt ist vorgesehen, daß der Cofaktor NAD(P) oder NAD(P)H ist. Erfindungswesentlich ist es, daß diese Cofaktoren an einen polymeren Spacer mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 20 000 gekoppelt sind. Dadurch wird einerseits das Austreten des niedermolekularen Cofaktors aus der Polymermatrix verhindert, und andererseits nimmt der so modifizierte Cofaktor seine Spacer-Funktion wahr. Die polymere Spacerkomponente ist bevorzugt ausgewählt aus Polyethylenglykol, Polypeptid oder Polysaccharid. Durch die eintretende Komplexbildung zwischen Enzym und Cofaktor wird erreicht, daß der Cofaktor auch in der Polymerstruktur noch zum korrespondierenden aktiven Zentrum hin orientiert ist. Auf diese Weise liegt der Cofaktor für das aktive Zentrum in einer sehr effizienten Konzentration vor.

Erfindungsgemäß umschließt die Coimmobilisatschicht alle an und für sich aus dem Stand der Technik bekannten Dehydrogenasen bzw. Reduktasen. Ein Überblick ist z. B. in P.D. Boyer (Ed.): The Enzymes, Vol. XI, Academic Press, San Francisco, London, 1975, angegeben. Bevorzugt ist die Reduktase bzw. Dehydrogenase NAD- bzw. NADP-abhängig.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform (Patentanspruch 7) schlägt vor, daß die Polymermatrix zusätzlich Redoxmediatoren enthält. Diese Ausführungsform ist besonders bevorzugt, wenn die Coimmobilisatschichten für die Herstellung von Elektropolymeren vorgesehen sind. Beispiele für Redoxmediatoren sind Phenazine, Phenoxazine, Phenothiazine oder Chinone.

Die beschriebenen Coimmobilisatschichten weisen bevorzugt eine Dicke von 0,5 bis 50 µm auf. Ganz besonders bevorzugt ist eine Dicke von 0,5 bis 25 µm.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der vorstehend beschriebenen Coimmobilisatschicht. Dabei wird erfindungsgemäß so vorgegangen, daß zuerst eine wäßrige Lösung der Dehydrogenase und/oder Reduktase mit ihren Cofaktoren hergestellt wird und diese Lösung in eine wäßrige Lösung eines polymerisierbaren Monomeren oder in eine Präpolymer- bzw. Polymerlösung eingebracht wird. Erfindungsgemäß wird dabei so vorgegangen, daß 0,5 bis 30 mg Enzymprotein (Enzym + Cofaktor) pro 10 µl wäßrige Pufferlösung eingesetzt wird. Als wäßrige Pufferlösung kann z. B. 0,1 molare KCl dienen. Zur Herstellung der Polymermatrix ist es bevorzugt, die vorstehend beschriebene Lösung in eine wäßrige Pufferlösung eines polymerisierbaren Monomers oder in eine wäßrige Präpolymerlösung einzubringen. Als Monomere kommen dabei alle Ausgangsverbindungen in Frage, die sich zu den vorstehend erwähnten polymeren Netzwerken vernetzen lassen. Bevorzugt ist hierbei Pyrrol.

Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von wasserlöslichen Präpolymeren wie z. B. wasserlösliches Urethan. Möglich ist auch, Polymer anzulösen und die erhaltene Lösung einzusetzen. Wäßrige Präpolymerlösungen der vorstehend beschriebenen Polymere sind kommerziell erhältlich, z. B. bei Sigma, Deisenhofen.

Aus stofflicher Sicht umfaßt die Erfindung insbesondere alle Dehydrogenasen und/oder Reduktasen, die NAD- bzw. NADP-abhängig sind. Es wird hierbei bevorzugt 1 Molekül Cofaktor pro Untereinheit des Enzyms eingesetzt. Sollte das Enzym z. B. vier Untereinheiten (Subunit) aufweisen, können bis zu vier Moleküle Cofaktor eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, daß die so hergestellte Lösung vernetzt wird. Es kann so vorgegangen werden, daß die Lösung auf den zu beschichtenden Gegenstand aufgebracht wird, z. B. auf eine Elektrodenoberfläche, ein semipermeables Membran oder ein inertes Trägermaterial, und daß dann die Vernetzung erfolgt.

Das Aufbringen kann im Prinzip durch alle aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren wie Aufsprühen, Aufschleudern oder auch Tauchen erfolgen. Die Polymerisierung kann durch alle bekannten Verfahren wie physikalische Prozesse, chemische, photochemische, radikalchemische oder elektrochemische Reaktionen erfolgen. Die Dauer und Verfahrensparameter richten sich nach dem ausgewählten Verfahren und sind aus dem Stand der Technik bekannt.

Bei Elektropolymerisierung wird so vorgegangen, daß der zu beschichtende Gegenstand in die Lösung eingetaucht wird und die Vernetzung z. B. durch Anlegen einer Spannung erfolgt.

Letztlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Schichten für Sensoren, bevorzugt für Enzymsensoren. Für diesen Anwendungsfall sind die vorstehend beschriebenen Coimmobilisatschichten besonders geeignet.

Für Sensor-Anwendungen bei Elektropolymeren ist der gleichzeitige Einschluß von Elektronenmediatoren vorteilhaft, insbesondere aus der Gruppe der bereits vorstehend erwähnten Phenazine, Phenoxazine, Phenothiazine oder Chinone, um eine Regenerierung des Cofaktors amperometrisch zu ermöglichen. Die enzymatische Stoffwandlungen in Reaktoren erfolgt durch die Coimmobilisierung einer Dehydrogenase und einer

Reduktase durch die Regenerierung des polymermodifizierten NAD(P)/NAD(P)H.

Die Erfindung wird nachstehend anhand eines Ausführungsbeispiels und der Fig. 1 und 2 näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 das Ansprechverhalten einer Polypyrrol-Coimmobilisat-beschichteten Platinelektrode, und

Fig. 2 die Kalibrierung des enzymatischen Ethanol-sensors durch Auswertung der Aufstockung unterschiedlicher Ethanolkonzentrationen unter Batch-Bedingungen.

Eine wäßrige Lösung von 1 mg Moldola Blau, ca. 2 mg Polyethylenglykol-nNAD(H) und 3 mg Alkoholdehydrogenase aus Hefe in 2 ml 0,1 M KCl wurde mit Stickstoff entgast. Nach Zugabe von 25 µl Pyrrol wurde eine polierte Platinelektrode eingetaucht und für eine Minute auf 700 mV vs. Ag/AgCl (3 M KCl) polarisiert. Die auf der Elektrodenoberfläche abgeschiedene Polymerschicht wird nach gründlicher Spülung mit destilliertem Wasser in Puffer gelagert. Zur Messung wird sie in eine PBS-Pufferlösung getaucht und gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode mit einer Polarisationsspannung von 300 mV versehen. Das Ansprechverhalten der Elektrode ist in Fig. 1 dargestellt. Die Ansprechzeit (90%) nach Zugabe von 6,8 mM Ethanol beträgt ca. 8 Sekunden. Die Abhängigkeit des Sensorsignals (Steady-state-Strom) von der Ethanolkonzentration ist in Fig. 2 dargestellt. Die gezeigten Ergebnisse wurden am dritten Tag nach der Elektrodenpräparation erhalten.

Die erfindungsgemäße Schicht erlaubt somit langzeitstabile Immobilisierungsschichten, die sowohl eine optimale Enzym-Cofaktor- als auch Cofaktor-Mediator-Wechselwirkung garantierende Coimmobilisierung von Dehydrogenase und/oder Reduktase mit ihrem Cofaktor unter Nutzung des schonenden und stabilisierenden physikalischen Einschlusses ermöglicht. Seine prinzipielle Eignung auf der Grundlage von Elektropolymeren einschließlich der simultanen Inkorporierung von Redoxmediatoren gestattet das Aufbringen von Immobilisatschichten auf lokal definierte Elektrodenflächen sowie ein sehr schnelles Ansprechverhalten.

Im Hinblick auf die im allgemeinen hohe Stabilität und Aktivität von Dehydrogenasen sowie dem Umstand, daß mehr als 250 Dehydrogenasen für verschiedenste Analyte bekannt sind, ermöglicht dieses einfache und kostengünstige Verfahren zur Coimmobilisierung von Dehydrogenase (gegebenenfalls Reduktase) und Cofaktor eine Vielzahl von Anwendungen sowohl für die Realisierung neuartiger "reagenzloser" Enzymsensoren als auch für Bioreaktor-Entwicklungen zur enzymkatalysierten Stoffwandlung.

#### Patentansprüche

1. Coimmobilisatschicht, enthaltend — in eine Polymermatrix eingeschlossen — Dehydrogenase und/oder Reduktase und ihre Cofaktoren bzw. deren Komplexe, wobei der Cofaktor an einen polymeren Spacer mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 20 000 gekoppelt ist.
2. Coimmobilisatschicht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Spacer ausgewählt aus Polyethylenglykol, Polypeptid oder Polysaccharid oder einer Mischung davon.
3. Coimmobilisatschicht nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymermatrix ein polymeres Netzwerk aus Polyacrylat, Polyvinylalkohol, Polysulfonsäureester, Polysaccharid,

- Polypeptid, quervernetztes Polypeptid, Polyurethan, Polypyrrol, Polyanilin, Poly-o-phenylendiamin, Polyphenol oder Polyphenothiazin ist.
4. Coimmobilisatschicht nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Cofaktoren polymer modifiziertes NAD(P) oder NAD(P)H ist. 5
5. Coimmobilisatschicht nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Dehydrogenase eine NAD- oder NADP-abhängige Dehydrogenase ist. 10
6. Coimmobilisatschicht nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Reduktase eine NAD- oder NADP-abhängige Reduktase ist. 15
7. Coimmobilisatschicht nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die polymere Matrix insbesondere bei Elektropolymeren zusätzlich einen Redoxmediator enthält.
8. Coimmobilisatschicht nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Redoxmediator ausgewählt ist aus der Gruppe der Phenazine, Phenoxazine, Phenothiazine oder Chinone. 20
9. Coimmobilisatschicht nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ihre Dicke im Bereich von 0,5 bis 50 µm liegt. 25
10. Verfahren zur Herstellung der Coimmobilisatschicht nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß
- (a) eine wäßrige Lösung der Dehydrogenase und/oder Reduktase mit ihren Cofaktoren bzw. deren Komplexen in eine wäßrige Lösung von polymerisierbaren Monomeren und/oder einer Präpolymer- oder Polymerlösung eingebracht wird, und 30
- (b) die so erhaltene Lösung vernetzt wird. 35
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Vernetzung des Präpolymers bzw. Polymers durch physikalische Prozesse, chemische, photochemische, radikalchemische oder elektrochemische Reaktionen erfolgt. 40
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß ein Molekül Cofaktor pro Untereinheit des Enzyms eingesetzt wird.
13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die nach Verfahrensschritt (a) erhaltene Lösung auf eine Elektrodenoberfläche oder semipermeable Membran oder ein inertes Trägermaterial aufgebracht und anschließend vernetzt wird. 45
14. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle einer Elektropolymerisierung die Vernetzung durch Einbringen der Elektrode in die Lösung direkt auf der Elektrodenoberfläche erfolgt. 50
15. Verwendung der Coimmobilisatschicht nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9 für Sensoren. 55

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

60

65

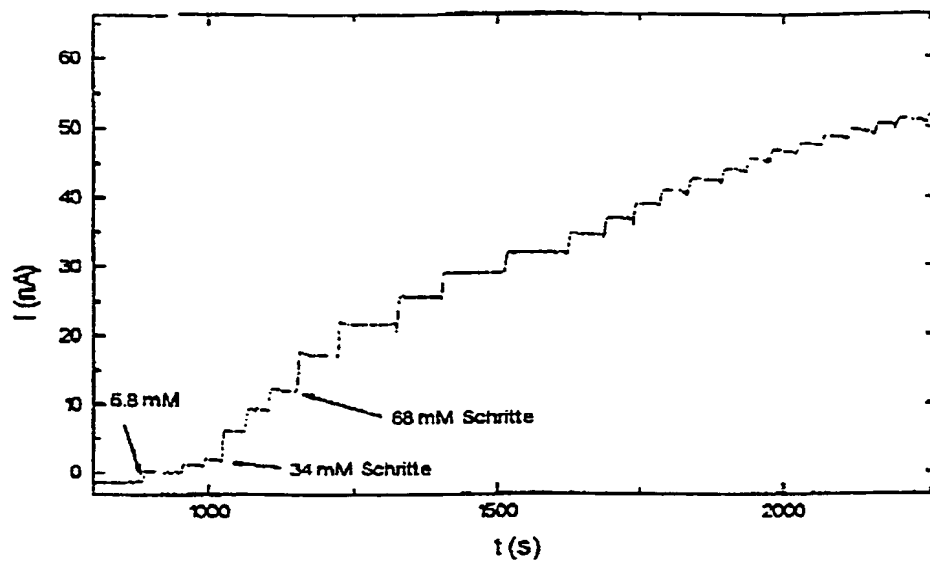


Fig.1

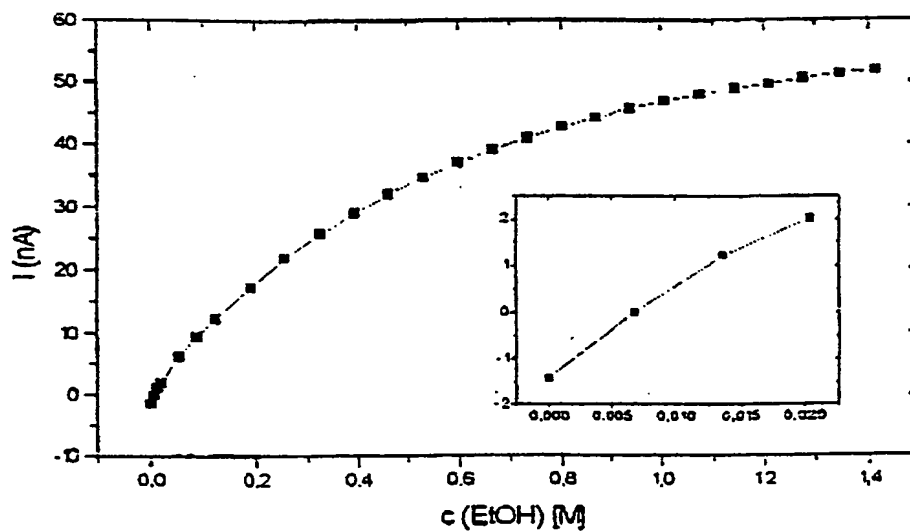


Fig.2